

校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620130154127

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**P-TEFb 重活化研究**

**Study of P-TEFb reconstitution**

**李游**

**指导教师姓名：陈瑞川教授**

**专 业 名 称：生物化学与分子生物学**

**论文提交日期：2016 年 9 月 6 日**

**论文答辩时间：2016 年 8 月 29 日**

**学位授予日期：2016 年 月 日**

**答辩委员会主席：王洪睿教授**

**评 阅 人：**

2016 年 9 月

# **Study of P-TEFb reconstitution**

Dissertation Submitted to

**Xiamen University**

in Partial Fulfilment of the Requirement

for the Degree of

**Doctor of Philosophy**

By

**You Li**

(Biochemistry and Molecular Biology )

**Dissertation Supervisors:**

**Prof. Ruichuan Chen**

2016

Xiamen, China

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目录

英文缩略对照 .....	1
摘 要.....	3
Abstract.....	5
第一章 前言 .....	7
1.1 核心 P-TEFb 的发现.....	8
1.1.1 P-TEFb 的发现基础 .....	8
1.1.2 CDK9 的发现与克隆 .....	9
1.1.3 Cyclin T 的发现与克隆 .....	10
1.1.4 HIV-1 的转录模式的提示 .....	10
1.1.5 核心 P-TEFb 的发现与功能 .....	11
1.1.6 DRB 非依赖性的转录延伸与 elongin、ELL、ELL2 的发现.....	11
1.2 P-TEFb 转录暂停重启的另外两个靶点.....	13
1.2.1 DSIF 与 NELF 的发现与功能 .....	13
1.2.2 P-TEFb-DSIF 与 P-TEFb-NELF 的研究 .....	14
1.3 P-TEFb 无活性复合物—7SK snRNP 复合物的发现 .....	15
1.3.1 7SK-P-TEFb 的发现 .....	15
1.3.2 HEXIM1/2-P-TEFb 的发现 .....	15
1.3.3 MePCE-P-TEFb 与 Larp7-P-TEFb 的发现 .....	17
1.3.4 KAP1-P-TEFb 的研究.....	17
1.3.5 P-TEFb 的无活性复合物的解离 .....	18
1.3.6 P-TEFb 无活性复合物的研究 .....	19
1.3.7 P-TEFb 的某种过渡状态 .....	19
1.4 P-TEFb 某些募集通道的发现.....	20
1.4.1 P-TEFb-CIITA .....	20
1.4.2 P-TEFb-NF-kappaB .....	20
1.4.3 P-TEFb-AR .....	21
1.4.4 P-TEFb-c-Myc .....	21
1.4.5 P-TEFb- AhR .....	21
1.4.6 P-TEFb- STAT3 .....	22
1.4.7 P-TEFb 募集通道的零星发现 .....	22
1.5 BRD4-P-TEFb 的发现.....	23
1.5.1 BRD4-P-TEFb 的发现 .....	23
1.5.2 BRD4-P-TEFb 的调控模式 .....	24
1.5.3 BRD4 及其家族广泛性研究 .....	25
1.6 SEC-P-TEFb 的发现.....	26
1.6.1 P-TEFb-AFF4 的早期发现 .....	26

1.6.2 AFF1/ENL/AF9-P-TEFb 复合物的发现 .....	27
1.6.3 SEC-P-TEFb/Tat 的研究 .....	28
1.6.4 P-TEFb 的 SEC-Paf1-Med 通道 .....	29
<b>1.7 nuclear Speckle 的研究.....</b>	<b>29</b>
1.7.1 nuclear Speckle 的早期电镜发现 .....	29
1.7.2 nuclear Speckle 的早期免疫学发现 .....	29
1.7.3 nuclear Speckle 的解构: snRNPs 的定位问题 .....	30
1.7.4 nuclear Speckle 的解构:SC35 (non-snRNPs) 的定位问题 .....	32
<b>1.8 与本文冲突的理论或模型 .....</b>	<b>34</b>
<b>1.9 研究内容和意义 .....</b>	<b>34</b>
1.9.1 研究内容.....	34
1.9.2 研究意义.....	35
<b>第二章 实验材料和方法 .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 实验材料与仪器 .....</b>	<b>37</b>
2.1.1 实验所用的细胞株.....	37
2.1.2 实验所用的菌株.....	37
2.1.3 实验所用的质粒.....	37
2.1.4 实验所用的仪器.....	38
2.1.5 试剂、药品、耗材.....	39
2.1.6 实验所用的抗体.....	40
<b>2.2 常用配制材料 .....</b>	<b>40</b>
2.2.1 大肠杆菌感受态的制备与细菌培养相关.....	41
2.2.2 分子克隆与分析相关溶液配方.....	41
2.2.3 细胞培养、转染及感染相关溶液.....	43
2.2.4 免疫荧光相关溶液.....	43
2.2.5 细胞蛋白抽提、制备相关溶液.....	44
2.2.6 Western blot 相关溶液 .....	45
<b>2.3 实验方法 .....</b>	<b>46</b>
2.3.1 大肠杆菌感受态的制备、转化与培养.....	46
2.3.2 质粒提取与检测.....	47
2.3.3 分子克隆.....	50
2.3.4 细胞培养与实验.....	52
2.3.5 细胞影像.....	55
2.3.6 蛋白质样品前处理及 western blot 分析 .....	56
2.3.7 流式细胞术分析.....	60
2.3.8 总 RNA 的提取 .....	60
2.3.9 逆转录 PCR(qRT-PCR).....	61
<b>第三章 结果与讨论 .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 P-TEFb 在核浆中应激解离的分子机制及其生理学意义 .....</b>	<b>64</b>
3.1.1 新的细胞抽提方案发现 CDK9 与 Cyclin T 存在解离状态 .....	64
3.1.2 CDK9 与 Cyclin T 的应激解离是一种广泛存在的现象 .....	67
3.1.3 CDK9 与 Cyclin T 的应激解离与无活性复合物解离高度伴随 .....	69



3.1.4 无活性复合物解离是 CDK9 与 Cyclin T 解离的先决条件 .....	70
3.1.5 PP1 去磷酸化是 CDK9 与 Cyclin T 发生解离的原因 .....	70
3.1.6 T186 位点是 CDK9 与 Cyclin T 在核浆中相互作用的关键 .....	72
3.1.7 P-TEFb 酶活性中心突变影响 T186 磷酸化及 Cyclin T 结合 .....	72
3.1.8 P-TEFb 在核浆中应激解离是其活化的中间过程 .....	73
<b>3.2 重活化 P-TEFb 复合物的形成条件 .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 活化的 P-TEFb 主要与 BRD4 或 SEC 结合且仅存于 HSF 组分 .....	74
3.2.2 同时敲低 BRD4, AFF1, AFF4 影响活化 P-TEFb 复合物的形成 .....	76
3.2.3 敲低 BRD4 或 AFF1/AFF4 影响对应通道的 P-TEFb 复合物活化 .....	78
3.2.4 双位点突变的 CDK9 无法重活化 .....	79
3.2.5 设计 20AA 多肽分别调控的 P-TEFb 重活化 .....	81
3.2.6 敲低 ELL2 影响 P-TEFb 的重活化 .....	83
3.2.7 P-TEFb 的重活化的两层含义 .....	84
<b>3.3 活化 P-TEFb 复合物的形成的机理 .....</b>	<b>85</b>
3.3.1 BRD4 与 CDK9 共孵育引发 T186 磷酸化 .....	85
3.3.2 AFF1 与 CDK9 共孵育引发 T186 磷酸化 .....	85
3.3.3 AFF4 与 CDK9 共孵育引发 T186 磷酸化 .....	87
3.3.4 ELL2 与 CDK9 共孵育不引发 T186 磷酸化 .....	88
3.3.5 CDK9 的 T186 磷酸化基于自身激酶活性 .....	89
3.3.6 BRD4 介导 CDK9 与 Cyclin T 重新组装成 BRD4 -P-TEFb .....	89
3.3.7 AFF4 介导 CDK9 与 Cyclin T 重新组装 .....	91
3.3.8 AFF1 介导 CDK9 与 Cyclin T 重新组装 .....	92
3.3.9 T186 突变可以在 HSF 结合 Cyclin T .....	93
3.3.10 T186 重新磷酸化不是 CDK9 与 Cyclin T 重新组装成活化的 P-TEFb 的必要条件 .....	94
3.3.11 S175D, T186E 突变的 P-TEFb 仅由对应伴侣负责组装 .....	95
3.3.12 20AA 多肽影响不同通道下 P-TEFb 的重活化 .....	96
<b>3.4 活化 P-TEFb 复合物的形成发生在 Speckle 中 .....</b>	<b>97</b>
3.4.1 探究 LSEN 与 Speckle 的关系 .....	97
3.4.2 CDK9 进入 Speckle 并重新磷酸化依赖于 BRD4 或 AFF1/4 而非 Cyclin T .....	100
3.4.3 CDK9 进入染色质需要 Cyclin T .....	103
3.4.4 Cyclin T 进入 Speckle 独立于 CDK9 .....	104
3.4.5 Cyclin T 进入 Speckle 需要 ELL2 .....	106
3.4.6 Cyclin T 进入染色质需要 CDK9 .....	108
<b>3.5 转录使用 P-TEFb 需要经历解离组装过程 .....</b>	<b>109</b>
3.5.1 有丝分裂期近乎全部 P-TEFb 处于无活性状态 .....	109
3.5.2 转录所需 P-TEFb 都经过解离活化 .....	111
3.5.3 抑制 Speckle 形成, P-TEFb 无法重活化 .....	113
<b>3.6 总结与讨论 .....</b>	<b>113</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>126</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>132</b>

## Contents

Abbreviation .....	1
Abstract in Chinese .....	3
Abstract in English.....	5
Chapter I Forewords.....	7
1.1 Discovery of core P-TEFb .....	8
1.1.1 Discovery of P-TEFb .....	8
1.1.2 Cloning of CDK9 .....	9
1.1.3 Cloning of Cyclin T .....	10
1.1.4 Brief summary and discussion 1 .....	10
1.1.5 Brief summary and discussion 2 .....	11
1.1.6 Brief summary and discussion 3.....	11
1.2 DSIF and NELF .....	13
1.2.1 Discovery of DSIF and NELF .....	13
1.2.2 Brief summary and discussion 4 .....	14
1.3 Discovery of 7SK snRNP .....	15
1.3.1 Discovery of 7SK-P-TEFb.....	15
1.3.2 Discovery of HEXIM1/2-P-TEFb.....	15
1.3.3 Discovery of MePCE-P-TEFb 与 Larp7-P-TEFb .....	17
1.3.4 Discovery of KAP1-P-TEFb.....	17
1.3.5 Dissociation of 7SK snRNP .....	18
1.3.6 Brief summary and discussion 5 .....	19
1.3.7 Brief summary and discussion 6 .....	19
1.4 Early discovery of P-TEFb pathways .....	20
1.4.1 Discovery of P-TEFb-CIITA .....	20
1.4.2 Discovery of P-TEFb-NF-kappaB .....	20
1.4.3 Discovery of P-TEFb-AR .....	21
1.4.4 Discovery of P-TEFb-c-Myc .....	21
1.4.5 Discovery of P-TEFb- AhR .....	21
1.4.6 Discovery of P-TEFb- STAT3 .....	22
1.4.7 Summary and discussion 7.....	22
1.5 Discovery of BRD4-P-TEFb.....	23
1.5.1 Discovery of BRD4-P-TEFb.....	23
1.5.2 Regulation of BRD4-P-TEFb .....	24
1.5.3 Study of BRD family .....	25
1.6 Discovery of SEC-P-TEFb .....	26
1.6.1 Discovery of P-TEFb-AFF4 .....	26

1.6.2 Discovery of AFF1/ENL/AF9-P-TEFb.....	27
1.6.3 Discovery of SEC-P-TEFb/Tat .....	28
1.6.4 Discovery of P-TEFb-SEC-Paf1-Med pathway.....	29
1.7 Discovery of nuclear Speckle .....	29
1.7.1 Discovery of nuclear Speckle, in terms of Electron Microscopy .....	29
1.7.2 Discovery of nuclear Speckle, in terms of immunofluorescence .....	29
1.7.3 Localization of snRNPs .....	30
1.7.4 Localization of non-snRNPs .....	32
1.8 Conflict .....	34
1.9 Research contents and significance .....	34
1.9.1 Research contents.....	34
1.9.2 significance .....	35
Chapter II Materials and methods .....	37
2.1 Reagents and instruments .....	37
2.1.1 Cell lines .....	37
2.1.2 Strains of bacteria .....	37
2.1.3 Plasmids .....	37
2.1.4 Instruments.....	38
2.1.5 Reagents and materials .....	39
2.1.6 Antibodies .....	40
2.2 Buffers .....	40
2.2.1 Buffers for E.coli .....	41
2.2.2 Buffers for cloning .....	41
2.2.3 Buffers for cell culture .....	43
2.2.4 Buffers for immunofluorescence .....	43
2.2.5 Buffers for protein samples.....	44
2.2.6 Buffers for Western blot.....	45
2.3 Protocols .....	46
2.3.1 E.coli related .....	46
2.3.2 Plasmid related.....	47
2.3.3 Cloning related.....	50
2.3.4 Cell culture related.....	52
2.3.5 Image related.....	55
2.3.6 western blot related .....	56
2.3.7 Flow cytometry .....	60
2.3.8 Total RNA isolation .....	60
2.3.9 qRT-PCR .....	61
Chapter III Results and Discussion.....	64
3.1 Study of P-TEFb dissociation .....	64
3.1.1 Discovery of P-TEFb dissociation .....	64
3.1.2 P-TEFb dissociation in different cells.....	67
3.1.3 P-TEFb dissociation with 7SK snRNP dissociation .....	69

3.1.4 7SK snRNP dissociation leads to P-TEFb dissociation .....	70
3.1.5 PP1 induces in P-TEFb dissociation .....	70
3.1.6 T186 dephosphorylation is important for P-TEFb dissociation.....	72
3.1.7 CDK9 activity is important for T186 phosphorylation .....	72
3.1.8 Brief Discussion 1 .....	73
<b>3.2 Conditions of P-TEFb reconstitution .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 Study of activated P-TEFb.....	74
3.2.2 Knock-down of BRD4/AFF1/AFF4 blocks P-TEFb reconstitution .....	76
3.2.3 Study of reconstitution pathway .....	78
3.2.4 CDK9 double mutations cannot reconstitute .....	79
3.2.5 20AA peptides impact P-TEFb reconstitution in vivo .....	81
3.2.6 Knock-down of ELL2 blocks P-TEFb reconstitution .....	83
3.2.7 Brief Discussion 2 .....	84
<b>3.3 Mechanism of P-TEFb reconstitution .....</b>	<b>85</b>
3.3.1 BRD4 induces CDK9-T186 phosphorylation .....	85
3.3.2 AFF1 induces CDK9-T186 phosphorylation .....	85
3.3.3 AFF4 induces CDK9-T186 phosphorylation .....	87
3.3.4 ELL2 cannot induce CDK9-T186 phosphorylation.....	88
3.3.5 CDK9-T186 autophosphorylation .....	89
3.3.6 BRD4 mediates P-TEFb reconstitution .....	89
3.3.7 AFF4 mediates P-TEFb reconstitution .....	91
3.3.8 AFF1 mediates P-TEFb reconstitution .....	92
3.3.9 T186 mutations bind Cyclin T in HSF .....	93
3.3.10 CDK9-T186 autophosphorylation is not required for P-TEFb reconstitution .....	94
3.3.11 BRD4 or SEC mediates reconstitution as indicated.....	95
3.3.12 20AA peptides impact P-TEFb reconstitution in vitro .....	96
<b>3.4 P-TEFb reconstitution in Speckle.....</b>	<b>97</b>
3.4.1 Study of LSEN and Speckle .....	97
3.4.2 BRD4,AFF1/4 but not Cyclin T bring CDK9 to Speckle .....	100
3.4.3 Cyclin T is required for P-TEFb recruitment.....	103
3.4.4 Cyclin T Speckle locating is independent of CDK9 .....	104
3.4.5 Cyclin T Speckle locating requires ELL2.....	106
3.4.6 Cyclin T recruitment requires CDK9 .....	108
<b>3.5 All P-TEFb reconstitute in the exit of mitosis .....</b>	<b>109</b>
3.5.1 All P-TEFb inactivated in mitosis.....	109
3.5.2 All P-TEFb reconstitute in the exit of mitosis .....	111
3.5.3 All P-TEFb reconstitute requires Speckle.....	111
<b>3.6 Summary and discussion.....</b>	<b>113</b>
<b>Reference .....</b>	<b>126</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>132</b>

## 英文缩略对照

Abbreviation	Full Name
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein, HEXIM1/7SK/ LARP7/BINCD3/P-TEFb
BRD4	Bromodomain-containing protein 4
CTD	C-terminal domain
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
EAF	ELL-associated factor
ELL	eleven-nineteen lysine-rich protein
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
NE	Nuclear Extract
HSEN	High Salt Extracted Nucleic
HSF	High salt fraction
LSEN	Low Salt Extracted Nucleic
LSF	Low salt fraction
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
NELF	Negative elongation factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Preinitiation complex
Pol II	RNA polymerase II
Pol II pausing	RNA polymerase II pausing
PP1 $\alpha$	Protein phosphatase 1 $\alpha$
PP2B / CaN	Protein phosphatase 2B /Calcineurin
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b

snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein particle
SEC	Super elongation complex

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘 要

P-TEFb 在基因转录调控中具有重要地位。因此围绕 P-TEFb 的研究是基因转录调控研究中的重点问题。为了适应转录本身的复杂性，P-TEFb 的活性调控以及其募集的方式也非常精致复杂。本文详细揭示了具有调控转录活性的，活化态 P-TEFb 的形成过程，即 P-TEFb 的重活化。

之前我们发现激酶活性受到限制的 P-TEFb 存在于核浆中的 7SKsnRNP 复合物中。在细胞受到外界刺激（如 HMBA）时可以从 7SKsnRNP 中解离而最终产生活化态的 P-TEFb。这个过程伴随着 CDK9-T186 位的去磷酸化。我们曾对这个过程中，所需的磷酸酶进行了筛选鉴定；发现需要 PP2B 和 PP1 的协调控制。其中 PP1 是 CDK9-T186 去磷酸化的直接原因。

有活性的 P-TEFb 大量以 BRD4-P-TEFb 和 SEC-P-TEFb 的形式存在，分布在细胞的某些固定组分中。根据现有认识，这些 P-TEFb 除了位于染色质外还大量分布在 Speckle 中，其生理学功能未知。

在本项研究中，有几个重要发现：

第一：P-TEFb 在从 7SKsnRNP 中解离出来时，产生一种 CDK9 与 Cyclin T 分离的过渡状态，从而彻底丧失活性。这些丧失活性的 CDK9 与 Cyclin T，随后可以组装成有活性的 P-TEFb。

第二：在 P-TEFb 恢复活性并形成 BRD4-P-TEFb 和 SEC-P-TEFb 的过程中，CDK9 需经由 BRD4、AFF1 或 AFF4 任意一条通道向 Speckle 募集形成 BRD4—CDK9、AFF1—CDK9 或 AFF4—CDK9 并通过 CDK9 自磷酸化恢复 T186 的苏氨酸磷酸化。在这个过程 BRD4—CDK9、AFF1—CDK9 以及 AFF4—CDK9 相互调整构象使得其可以与 Cyclin T 在 Speckle 中组装。

第三：Cyclin T 也需要经由 ELL2 通道向 Speckle 募集，为重组装做准备。CDK9 与 Cyclin T 的募集通道是各自独立、互不干扰的。它们在 Speckle 中重新组装形成 BRD4-P-TEFb 和 SEC-P-TEFb。

第四：P-TEFb 在 Speckle 中的重组装发生在向染色质募集之前，是向染色质募集的前提条件。Speckle 是 P-TEFb 具有活性的关键。

第五：在细胞处于分裂时，几乎所有 P-TEFb 进入 7SKsnRNP 变为无活性状态。

第六：我们认为，每一个 P-TEFb 从 7SKsnRNP 中解离出来后都需要经过重活化过程以形成 BRD4-P-TEFb 和 SEC-P-TEFb 从而指导转录延伸进程。

关键词：BRD4-P-TEFb；SEC-P-TEFb；Speckle；重活化



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.